

様式第 1 号

論文内容要旨

Comparative Studies on Enzymes  
Related to Sesquiterpenoid Biosynthesis in *Artemisia* Species

ヨモギ属植物の種間比較を用いたセスキテルペノイド生合成関連酵素遺伝子の研究

学位申請者氏名：小森彩  
研究指導教員：荻原保成 教授

## 【序】

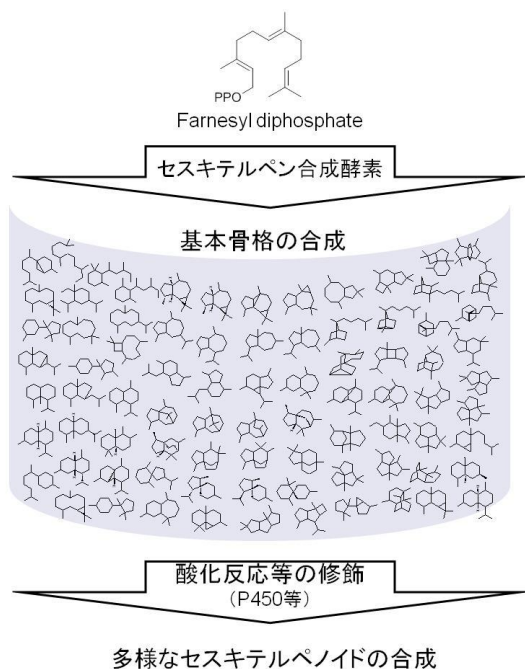


図1 セスキテルペノイドの生合成

セスキテルペノイドは、イソプレン単位が 3 個結合した化合物群の総称である。これらの化合物群には抗菌活性、殺虫性、抗腫瘍活性など様々な生理活性を持つ化合物が多く報告されている。セスキテルペノイドは、共通の前駆体である farnesyl diphosphate (FDP)からセスキテルペン合成酵素により基本骨格が生合成された後、酸化反応などの修飾を経て合成される (図 1)。したがって、セスキテルペノイド生合成機構を解明するためには、FDP 以降のセスキテルペン合成反応ならびに酸化反応等に関与する酵素遺伝子の単離、機能解析が必要である。

キク科ヨモギ属植物 (*Artemisia* spp.) は多様な化学構造を有するセスキテルペノイドを含有することが知られている。ヨモギ属植物の中でも、アジア原産の *Artemisia annua* が含有する過酸化架橋を有するセスキテルペノイド “artemisinin” は、既存の

マラリア薬耐性原虫に対して抗マラリア原虫活性を有することからその生合成に関する分子遺伝学的研究が精力的に行われてきた。その結果、*A. annua* から artemisinin 生合成関連酵素として FDP を環化し amorphadiene を生成する amorphadiene synthase (ADS) (Chang *et al.*, 2000; Mercke *et al.*, 2000; Wallaart *et al.*, 2001)、amorphadiene の 12 位炭素を選択的に酸化し artemisinic alcohol、artemisinic aldehyde を経て artemisinic acid を生成するシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP71AV1) (Ro *et al.*, 2006; Teoh *et al.*, 2006) などが明らかにされてきた。さらに、*A. annua* からは ADS 以外にも、*epi*-cedrol synthase (*ECS*)、 $\beta$ -caryophyllene synthase (*QHS*)、(E)- $\beta$ -farnesene synthase (*FS*)、germacrene A synthase (*GAS*) など 複数のセスキテルペン合成酵素遺伝子が単離されている (Shen *et al.*, 2007)。一方、*A. annua* 以外のヨモギ属植物は、多様な化学構造を有するセスキテルペノイドの蓄積が報告されているのにも関わらず、それら生合成関連酵素遺伝子の単離、機能解析はほとんど行われていない。

そこで本研究では、セスキテルペノイド生合成関連酵素に関する豊富な知見を有する *A. annua* と他のヨモギ属植物間で比較解析を行い、その生合成機構に関する新たな知見を得ることを目指した。第一章では、基本骨格の酸化反応を触媒する P450 に関して、第二章ではセスキテルペン合成酵素に関して述べる。

## 【研究結果】

### 第一章 ナチュラルバリエーションを用いた CYP71AV1 の比較機能解析

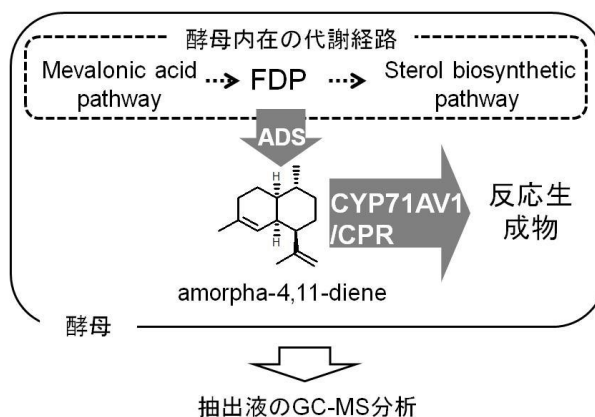
#### 1) CYP71AV1 相同遺伝子の単離

*A. annua* は抗マラリア活性を有する artemisinin を生産する。同属の *A. afra* ならびに *A. absinthium* の葉抽出液は抗マラリア活性を持つことが報告されている。しかし、当研究室の葉抽出物の分析結果ではこれら 2 種のヨモギ属植物から artemisinin ならびにその生合成中間物質が

検出されなかった (Suzuki *et al*, unpublished data)。そこで *A. afra* ならびに *A. absinthium* において artemisinin 生合成関連酵素遺伝子が発現しているかどうかを調べるために、葉から RNA を調製し RT-PCR を行った。その結果、両植物において *ADS* の発現は確認されなかったが、CYP71AV1 と 94% 以上のアミノ酸配列同一性を示す遺伝子 (CYP71AV1 相同タンパク質遺伝子) が発現していた。葉から CYP71AV1 の基質ならびに代謝産物が検出されないことから、この相同タンパク質は CYP71AV1 と異なる活性を持つことが期待された。

## 2) CYP71AV1 相同タンパク質の amorpho-4,11-diene に対する酸化活性

CYP71AV1 相同タンパク質 2 種が amorpho-4,11-diene を基質とするかどうか調べるため、*ADS* と *CYP71AV1* 相同遺伝子ならびに CYP71AV1 の酸化還元パートナーである cytochrome P450 reductase (CPR)<sup>\*1</sup> 遺伝子を酵母で同時発現させた (図 2)。反応生成物を GC-MS を用いて分析した結果、CYP71AV1 相同タンパク質発現酵母で amorpho-4,11-diene の酸化物が確認された。このことから、CYP71AV1 相同タンパク質は amorpho-4,11-diene を基質とすることがわかった。さらに、CYP71AV1 と CYP71AV1 相同タンパク質発現酵母の酸化活性を比較した結果、CYP71AV1 では 3 段階目の酸化物 artemisinin acid が蓄積するのに対し、CYP71AV1 相同タンパク質では 1 段階目の酸化物である artemisinic alcohol が蓄積した。このことから CYP71AV1 相同タンパク質では 2 段階目の反応が律速になっていることが推定された。これらの結果から、CYP71AV1 相同タンパク質は、CYP71AV1 と二段階目以降の酸化活性が異なることがわかった。



**図2 組換え酵母を用いたin vivoアッセイ系**  
酵母内でamorpho-4,11-diene synthase (ADS)とCYP71AV1を同時に発現させ、酵母由来のFarnesyl diphosphate (FDP)からCYP71AV1の基質であるamorpho-4,11-dieneを供給した。

## 3) タンパク質工学的手法を用いた構造と機能の相関解析

CYP71AV1 と CYP71AV1 相同タンパク質 2 種間のアミノ酸配列を比較した結果、全長 495 アミノ酸残基中異なるアミノ酸が 23 残基あった。そこで、この 23 残基を 3 区画に分け CYP71AV1 と CYP71AV1 相同タンパク質のキメラタンパク質を作成し、酵母で *ADS* ならびに *CPR* と同時発現させた。さらに、各キメラタンパクの反応生成物の解析結果と CYP71AV1 ホモロジーモデルによる基質結合部位の推定構造の結果を合わせて、CYP71AV1 の酸化反応に関わるアミノ酸残基を 4 残基に絞り込んだ。

CYP71AV1 におけるこれら候補アミノ酸 4 残基を相同タンパク質のものと入れ替えた 1 アミノ酸残基置換変異タンパク質を作成し、*ADS* 発現酵母を用いてその機能を解析した。その結果、CYP71AV1 S479F において、artemisinic alcohol の蓄積が確認された。CYP71AV1 S479F を発現させた酵母ミクロソーム画分に基質を添加した場合も同様の結果が得られた。これらの結果から、CYP71AV1 において Ser479 が二段階目の酸化反応制御に重要であることがわかった。

## 第二章 germacrene A 合成酵素の *A. absinthium* からの単離と機能解析

## 1) セスキテルペン合成酵素遺伝子の発現とセスキテルペンプロファイル比較

セスキテルペノイド基本骨格の合成反応は、セスキテルペノイドプロファイルの特徴づける重要な反応である。第二章ではセスキテルペン合成酵素に注目し、ヨモギ属種間比較を試みた。

*A. absinthium* の葉から RNA を調製し、*A. annua* で単離報告されている *ECS*、*QHS*、*FS*、*GAS* の発現を RT-PCR で調べた。その結果、*FS*、*QHS*、*GAS* の発現が両植物で確認された。葉の抽出物のセスキテルペノイドプロファイルと対応する合成遺伝子の発現を比較した結果、*FS* と *QHS* の発現と葉のセスキテルペノイドプロファイルが一致した。しかし、両植物ともに *GAS* の発現に対応する germacrene A\*<sup>2</sup> は検出されなかった。一方、germacrene A の異性体である germacrene D ならびに germacrene A の推定分子内環化物であるセリナン骨格を持つセスキテルペノイドが両植物種の葉のセスキテルペノイドプロファイル中に確認された。このことから、*GAS* の代謝産物プロファイルが植物体中で変化していることが示唆された。

## 2) 酵母発現系を用いた推定 *GAS* の機能解析

*A. annua* ならびに *A. absinthium* から推定 *GAS* を単離し、酵母で発現させた。その代謝産物を比較した結果、これら酵素間で検出された代謝産物に差は見られなかった。しかし、培養液に buffer を添加し培養液を中性に保って酵母を培養した場合 germacrene A が検出されるのに対し、buffer 未添加培養液では germacrene A は検出されずセリナン骨格を持つセスキテルペンが検出された。このことから、*GAS* の代謝産物は環境によって影響を受けることが示された。

### 【討論】

本研究の第一章において発表者は、ヨモギ属植物の種間におけるナチュラルバリエーションを利用し、CYP71AV1 の Ser479 が二段階目の酸化反応制御に関与していることを示した。CYP71AV1 のモデルと artemisinic alcohol のドッキングモデルを作成したところ、Ser479 は CYP71AV1 の C 末端側に存在するループ上に位置し、そのループが artemisinic alcohol の反応部位を覆うように存在することが示された。このことから、Ser 残基から Phe 残基への置換によって、ループ構造またはループの配置に変化が生じ、その結果二段階目の酸化反応が抑制されたと推測された。

Ro らは、artemisinin の半合成を目指し artemisinic acid を過剰量生産する改変酵母を作出し、その改変酵母で *ADS* と *CYP71AV1* を発現させることで、培養液 1L あたり 250mg/L の artemisinic acid の合成に成功した (Ro *et al*, 2006, Ro *et al*, 2008)。現在、CYP71AV1 の二段階目の酸化産物である artemisinic aldehyde から dihydroartemisinic aldehyde を経る経路が artemisinin

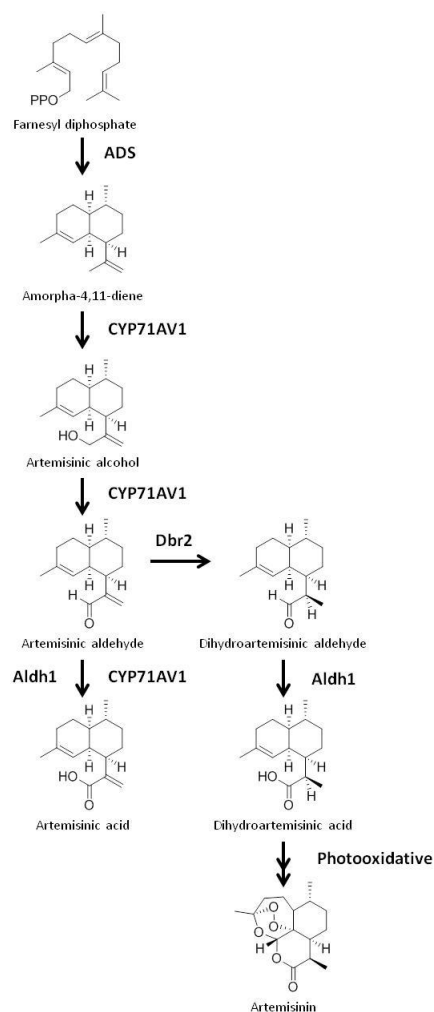


図3 artemisinin 生合成経路

ADS, amorpha-4,11-diene synthase; CYP71AV1, amorpha-4,11-diene monooxygenase; Dbr2, artemisinic aldehyde  $\Delta 11(13)$  reductase; Aldh1, aldehyde dehydrogenase

生合成主要経路として提唱されている（図 3）。さらに、その経路に関わる酵素遺伝子すでに単離されている。今後、artemisinic aldehyde を蓄積する CYP71AV1 の作出が必要になると考えられる。発表者は Ser479 付近にバリエーションを持つ CYP71AV1 相同タンパク質遺伝子が *A. afra* ならびに *A. absinthium* 以外のヨモギ属植物において存在していること明らかにしている。今回示したナチュラルバリエーションを利用した比較機能解析方法は、CYP71AV1 の構造と機能の相関に関する知見を得るうえで有用な手法の一つといえる。

さらに発表者は、第二章で GAS の代謝プロファイルが環境によって影響を受けることを示した。我々の研究室では、ADS に関しても環境による代謝プロファイルの変化に関する知見を得ている（Suzuki *et al*, unpublished data）。このことから、セスキテルペン合成酵素の発現環境は、酵素を用いた物質生産において重要な要因であることがわかった。

植物が生産する有用物質は、植物体内における存在量が少ないものが多く、またコスト面から全化学合成が難しい化合物が多い。そのため微生物等を利用した生産が注目されてきた。発表者は多様なセスキテルペノイドを生産するヨモギ属植物に注目し、ヨモギ属種間で遺伝子発現比較、成分比較、酵素機能比較を行った。その結果、セスキテルペノイド生合成関連酵素の構造機能相関ならびに代謝産物プロファイルに関して新たな知見が得られた。これらの知見は、微生物等を利用し酵素学的にセスキテルペノイドを合成する上で有用な知見だろう。

#### 【まとめ】

- 1) CYP71AV1 相同遺伝子が artemisinin 非産生ヨモギ属植物で発現していた。
- 2) CYP71AV1 相同遺伝子を用いて CYP71AV1 の構造と機能の相関に関する新たな知見が得られた。
- 3) セスキテルペン合成酵素の代謝プロファイリングは環境要因により影響を受けることが示唆された。

#### 【注釈】

##### \*1) cytochrome P450 reductase (CPR)

NADPH から電子を受け取り、P450 に電子を供給する還元酵素。P450 の酸化反応には、ヘムを還元し P450 に結合した酸素分子を活性化するための電子の供給が必要であることから、P450 の酵素活性を見る際は CPR 等の還元酵素が必要になる。

##### \*2) germacrene A

GC-MS を用いて分析した時、germacrene A は  $\beta$ -elemene として検出されることが知られている。これは、試料注入時の高温処理により分子内環化（Cope 転位）が起こるためと考えられている。本研究で germacrene A は  $\beta$ -elemene として検出した。